

Nucleic acid sequencing method using one labelled nucleotide at one step cycles comprising elongation, wash, label detection and removal of label, then repeating

Patent Number: DE4141178
Publication date: 1993-06-17
Inventor(s): ANSORGE WILHELM DR (DE)
Applicant(s): EUROP LAB MOLEKULARBIOLOG (DE)
Requested Patent: DE4141178
Application Number: DE19914141178 19911213
Priority Number(s): DE19914141178 19911213
IPC Classification: C07H21/04 ; C12Q1/68 ; G01N33/68
EC Classification: C12Q1/68E, C12N15/10
Equivalents:

Abstract

Claimed is a nucleic acid (NA) sequencing method in which a double strand of an at least partially single stranded template NA is synthesised starting from a double stranded NA piece or a primer by (i) incubation of the NA with a DNA elongation mixt. including a polymerase and one of the four nucleotides which is labelled, (ii) sepg. the NA from the elongation mixt., (iii) detection of any labelled nucleotide insertions, (iv) removal of the label if there had been an insertion, and repeating (i)-(iv) for all four nucleotides separately. Pref., the NA is anchored to a fixed phase such as biotin/avidin.
USE/ADVANTAGE - Very long NAs and small amts. of NAs can be detected with a high accuracy since each DNA mol. contributes to the labelling. The limited capacity of gel matrixes is overcome so that any length of NA can be sequenced. Even if a wrong nucleotide had been incorporated the wrong signal is removed so that it does not influence further sequencing.

Data supplied from the esp@cenet database - 12



19 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

12 **Offenlegungsschrift**
10 **DE 41 41 178 A 1**

51 Int. Cl.⁵:
C 12 Q 1/68
G 01 N 33/68
C 07 H 21/04
// C12N 9/22

21 Aktenzeichen: P 41 41 178.1
22 Anmeldetag: 13. 12. 91
43 Offenlegungstag: 17. 6. 93

DE 41 41 178 A 1

71 Anmelder:

Europäisches Laboratorium für Molekularbiologie
(EMBL), 6900 Heidelberg, DE

74 Vertreter:

Weickmann, H., Dipl.-Ing.; Fincke, K., Dipl.-Phys.
Dr.; Weickmann, F., Dipl.-Ing.; Huber, B.,
Dipl.-Chem.; Liska, H., Dipl.-Ing. Dr.-Ing.; Prechtel,
J., Dipl.-Phys. Dr.rer.nat.; Böhm, B., Dipl.-Chem.Un-
iv.
Dr.rer.nat., Pat.-Anwälte, 8000 München

72 Erfinder:

Ansorge, Wilhelm, Dr., 6901 Gaiberg, DE

54 Verfahren zur Sequenzierung von Nukleinsäuren

- 57 Zur Sequenzierung von Nukleinsäuren sequenziert man zu einer zu sequenzierenden, zumindest teilweise einzelsträngigen Nukleinsäure als Template-Strang mit Hilfe einer geeigneten Polymerase und allen vier Nukleotiden, ausgehend von einem Primer oder einem doppelsträngigen Teilstück, Schritt für Schritt einen Komplementärstrang, wobei man markierte Nukleotide verwendet und führt folgende Schritte durch:
- (1) Inkubieren der mit dem Primer versehenen oder teilweise doppelsträngigen Nukleinsäure mit einer Inkubationsmischung, bestehend aus einer Polymerase, einer der vier Nukleotidarten in markierter Form und anderen für die Kettenpolymerisation benötigten Substanzen, wobei ein markiertes Nukleotid in den wachsenden Komplementärstrang eingebaut wird in dem Fall, daß das nächste auf dem Template-Strang vorhandene Nukleotid zu dem verwendeten markierten Nukleotid komplementär ist,
 - (2) Trennen der gegebenenfalls um ein Nukleotid verlängerten Nukleinsäure von der Inkubationsmischung von Schritt (1) und Durchführung eines oder mehrerer Waschschrte in an sich bekannter Weise,
 - (3) Bestimmen des Einbaus eines Nukleotids anhand seiner Markierung, und
 - (4) falls der Einbau eines markierten Nukleotids erfolgt ist, Entfernen der Markierung,
- wobei die Schritte (1) bis (4) jeweils cyclisch für alle vier Nukleotidarten durchgeführt werden.

DE 41 41 178 A 1

Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Sequenzierung von Nukleinsäuren.

Sequenzierungen von Nukleinsäuren zählen heutzutage in biochemischen Laboratorien zu den täglichen Routineaufgaben. Dabei werden Sequenzierungen normalerweise nach einer der beiden Standardsequenzierungstechniken durchgeführt, nämlich entweder der chemischen Abbaumethode nach Maxam-Gilbert, oder aber der enzymatischen Komplementärstrangsynthesemethode nach Sanger. Gegenwärtig bekannte automatisierte Sequenzierungsmethoden nach der Sanger-Methode verwenden für die Markierung entweder endmarkierte Primer oder aber markierte Terminator-ddNTPs. Bei den Standardsequenzierungstechniken werden die markierten Fragmente auf einem nach der Größe trennenden Medium, z. B. einem Polyacrylamidgel, aufgetrennt und über die Markierung bestimmt. Markierungen sind hierbei radioaktive Markierungen, Fluoreszenzmarkierungen etc.. Die Trennkapazität der Gelmatrix limitiert hierbei die Auflösung und die Länge der DNA-Sequenz, welche bestimmt werden kann.

Dem sind mit den bisher bekannten Systemen eindeutige Grenzen gesetzt. Da eben Sequenzierungen jedoch so häufig durchgeführt werden, ist es auf alle Fälle wünschenswert, Verbesserungen gegenüber den bekannten Methoden zu ermöglichen.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es daher, ein Verfahren zur Sequenzierung von Nukleinsäuren bereitzustellen, bei dem auch sehr lange Nukleinsäuresequenzen bestimmt werden können und bei dem auch bereits sehr kleine Mengen an Nukleinsäure zu eindeutigen Ergebnissen führen.

Gelöst wird diese Aufgabe durch das erfindungsgemäße Verfahren zur Sequenzierung von Nukleinsäuren, bei dem man zu einer zu sequenzierenden, zumindest teilweise einzelsträngigen Nukleinsäure als Template-Strang mit Hilfe einer geeigneten Polymerase und allen vier Nukleotiden, ausgehend von einem Primer oder einem doppelsträngigen Teilstück, Schritt für Schritt einen Komplementärstrang synthetisiert, wobei man markierte Nukleotide verwendet, und welches folgende Schritte umfaßt:

- (1) Inkubieren der mit dem Primer versehenen oder teilweise doppelsträngigen Nukleinsäure mit einer Inkubationsmischung, bestehend aus einer Polymerase, einer der vier Nukleotidarten in markierter Form und anderen für die Kettenpolymerisation benötigten Substanzen, wobei ein markiertes Nukleotid in den wachsenden Komplementärstrang eingebaut wird in dem Fall, daß das nächste auf dem Template-Strang vorhandene Nukleotid zu dem verwendeten markierten Nukleotid komplementär ist,
- (2) Trennen der gegebenenfalls um ein Nukleotid verlängerten Nukleinsäure von der Inkubationsmischung von Schritt (1) und Durchführung eines oder mehrerer Waschschritte in an sich bekannter Weise,
- (3) Bestimmen des Einbaus eines Nukleotids anhand seiner Markierung, und
- (4) falls der Einbau eines markierten Nukleotids erfolgt ist, Entfernen der Markierung.

wobei die Schritte (1) bis (4) jeweils cyclisch für alle vier Nukleotidarten durchgeführt werden.

Der ganz neue Ansatz, welcher zum erfindungsgemäßen Verfahren geführt hat, liegt darin, daß hier für die Komplementärstrangbildung nur eine Art von Nukleotid und zwar in markierter Form angeboten wird. Ist hier also die nächste auf dem Templatestrang vorliegende Base komplementär zu dem in der Inkubationsmischung vorhandenen markierten Nukleotid, erfolgt der Einbau des Nukleotids mitsamt seiner Markierung durch die Polymerase. Im Rahmen der Erfindung wird als Polymerase eine solche eingesetzt, welche fähig ist, das markierte Nukleotid in den wachsenden Komplementärstrang einzubauen. Abhängig von der Art der zu bestimmenden Nukleinsäure können hier also die bekannten Polymerasen, wie DNA-Polymerase, z. B. T7 DNA-Polymerase, verwendet werden. Als zu bestimmende Nukleinsäuren sind nicht nur DNA-Fragmente, sondern auch RNAs geeignet. Für den Fall, daß nun also ein markiertes Nukleotid eingebaut wird, wird dies über die Markierung festgestellt und damit der Rückschluß auf die komplementäre Base im Templatestrang ermöglicht.

Ist die Base auf dem Templatestrang nicht komplementär zu dem angebotenen markierten Nukleotid, erfolgt kein Einbau und es wird kein Markierungssignal erhalten.

Das erfindungsgemäße Verfahren wird weiterhin durch die nachfolgende Entfernung der Markierung für den Fall, bei dem der Einbau eines markierten Nukleotids stattgefunden hat, gekennzeichnet. Mit "Entfernung der Markierung" ist im Rahmen der Erfindung gemeint, daß die Nukleinsäure in einer Weise behandelt wird, daß das Markierungssignal verschwindet. Dies bedeutet jedoch nicht, daß chemisch eine Abspaltung des markierenden Molekülteils stattfinden muß, es ist u. a. auch eine Bleichung mit einem starken Laser im Fall einer Fluoreszenzmarkierung denkbar (siehe z. B. B. Scalettar et al., Biophys. J. 53, 215 (1988) oder Mathies, R.A. Stryer, L., Single-Molecule Fluorescence Detection: A Feasibility Study using Phycoerythrin. Applications of Fluorescence in the Biomedical Sciences, S. 129—140 (1986) Alan R. Liss, Inc.). Es ist in jedem Fall aber unerlässlich, daß während des Schritts (4) durch die Entfernung der Markierung das markierte Nukleotid nicht chemisch so modifiziert wird, daß die Anpolymerisation des nächsten zum Templatestrang komplementären Nukleotids verhindert wird.

Wird im erfindungsgemäßen Verfahren beispielsweise bei der Bestimmung einer DNA-Sequenz als nächste Base nach dem Primer oder partiellen Doppelstrang markiertes dATP eingebaut, ergibt sich aufgrund des Markierungssignals, welches von dem Kontrollsignal der DNA ohne Markierung abweicht, für den Templatestrang an dieser Position, daß die Base T vorhanden ist. Sind auf dem Templatestrang mehrere gleiche Basen, hier also Thymin, vorhanden, werden im Komplementärstrang entsprechend viele Adenosinmoleküle eingebaut, wodurch sich ein entsprechend stärkeres Markierungssignal ergibt.

Derselbe Schritt, der beispielsweise für das markierte Nukleotid Adenosin in der Inkubationsmischung von Schritt (1) beschrieben wurde, wird aufeinanderfolgend cyclisch für alle Nukleotidarten durchgeführt. So wird für jede Base auf dem Templatestrang letztendlich das komplementäre markierte Nukleotid angeboten, in die Kette eingebaut, wobei aufgrund der Entfernung der Markierung nach jedem entsprechenden Einbau nur jeweils das letzte eingebaute markierte Nukleotid ein Signal erzeugt. Aus diesem Grund ist das Markierungssi-

gnal nicht akkumulativ und die Genauigkeit des Verfahrens sehr groß.

Fig. 1 zeigt mit Hilfe eines Flußdiagramms schematisch den Ablauf des Verfahrens.

Im Rahmen der Erfindung ist es bevorzugt, eine einzelsträngige Nukleinsäure zur Sequenzierung zu verwenden und in 5'-3'-Richtung vor die zu sequenzierende Sequenz ein Oligonukleotid als Primer anzuhybridisieren.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird die zu sequenzierende Nukleinsäure vor Schritt (1) an eine feste Phase gebunden. Dies ermöglicht es, insbesondere in automatisierten Systemen, die Nukleinsäure leicht in die für die verschiedenen Schritte benötigten Lösungen und Mischungen einzutauchen und auch von diesen Lösungen leicht wieder zu trennen.

Es ist dabei wichtig, daß die feste Phase keinen oder nur wenig Background für das Markierungssignal abgibt, z. B. muß, falls Fluoreszenz als Markierung verwendet wird, die feste Phase aus einem Material bestehen, das nicht im selben Wellenlängenemissionsbereich fluoresziert wie die Fluoreszenzmarkierung der verwendeten Nukleotide.

Die Verankerung der Nukleinsäure an der festen Phase kann nach an sich bekannten Methoden erfolgen, vorzugsweise erfolgt die Verankerung über ein spezifisches Bindepaar, dessen einer Partner mit der festen Phase verbunden ist und dessen anderer Partner an die Nukleinsäure gebunden ist. Besonders bevorzugt wird hier als spezifisches Bindepaar im Rahmen der Erfindung das System Biotin/Avidin oder Biotin/Streptavidin verwendet, wobei wiederum vorzugsweise Avidin bzw. Streptavidin an die feste Phase nach an sich bekannten Methoden gebunden ist und die Nukleinsäure durch Biotin modifiziert ist.

Als feste Phase sind alle Materialien geeignet, die inert gegenüber den Substanzen in den verwendeten Lösungen sind, eine Fixierung der Nukleinsäure erlauben und, wie oben erwähnt, nicht mit der Markierung differieren. Als bevorzugte Beispiele können hier Glas, eine Polymermembran oder Polymer- oder Glaskügelchen, sogenannte beads, genannt werden.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung verwendet man anstelle von Nukleinsäuren in an eine Festphase fixierter Form ein Durchflußsystem für die Schritte (1) bis (4), bei dem die Nukleinsäure in Lösung bleibt und mit Hilfe von Filtern und/oder Kapillaren von den jeweils verwendeten anderen Substanzen getrennt wird.

Als Markierung in den Nukleotiden wird im Rahmen der Erfindung vorzugsweise eine Fluoreszenzmarkierung verwendet. Hierbei können insbesondere Fluoreszenzmarkierungen verwendet werden, wie sie in der deutschen Patentanmeldung P 41 25 745 beschrieben sind. Auch die sogenannte "time resolved fluorescence" kann vorteilhaft als Markierung verwendet werden.

Im Rahmen der Erfindung werden als Nukleotide Dideoxynukleotide verwendet. In einer weiteren bevorzugten Ausgestaltung der Erfindung können jedoch auch Dideoxynukleotide oder sogenannte "gefangene" (caged) Nukleotide (s. z. B. Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, Richard P. Haugland, 1989, Molecular Probes, Inc., Eugene, USA oder Matthews und Kricka, Analyt. Biochem. 169, 1 (1988)) verwendet werden. Auch ein Nukleotid erscheint geeignet, bei dem an die 3'OH-Gruppe der Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist (Krayevsky A., BBA, 1986, 868, S. 136). Hieraus ergibt sich, daß jeweils nur ein Dideoxyri-

bonukleotid o. ä. eingebaut werden kann, da die Polymerase durch diese sogenannten Terminatoren keine Möglichkeit mehr hat, die Kette weiter zu verlängern, auch wenn das der nächsten Base auf dem Templatestrang entsprechende Nukleotid vorhanden ist. Dies bedeutet, daß auch wenn gleiche Basen mehrfach auf dem Templatestrang nacheinander vorkommen, jeweils nur in einem Inkubationsschritt ein Nukleotid eingebaut wird. Dies kann zur Genauigkeit der Methode beitragen. Nach der Bestimmung der Markierung wird das Dideoxynukleotid dann in ein "dNTP-ähnliches polymerisationsverlängerbares Nukleotid" überführt. Die Termination der Komplementärstrangsynthese wird dadurch aufgehoben und der nächste Zyklus der Schritte (1) bis (4) kann erfolgen. Es wird jedoch durch die Verwendung von Dideoxynukleotiden auch ein nochmals vereinfachtes Verfahren ermöglicht, bei dem alle vier Nukleotidarten als Dideoxynukleotide eingesetzt werden, wobei jedoch die vier verschiedenen Dideoxys jeweils auch verschiedene Fluoreszenzmarkierungen aufweisen. Welches der Dideoxynukleotide dann tatsächlich in den wachsenden Komplementärstrang eingebaut wurde, kann in Schritt (3) des erfindungsgemäßen Verfahrens anhand der vorhandenen Markierung festgestellt werden. Diese bevorzugte Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens bedeutet daher noch eine wesentliche Arbeitserleichterung und Beschleunigung des Sequenzierungsverfahrens.

Im Rahmen der Erfindung ist es bevorzugt, die Nukleinsäure vor der Sequenzierung zu denaturieren. Des weiteren ist es bevorzugt, jeweils nach Schritt (3) oder (4) mit einem dem verwendeten markierten Nukleotid von Schritt (1) entsprechen den nicht markierten Nukleotid eventuell vorhandene Lücken im Komplementärstrang aufzufüllen. Auch diese Maßnahme soll die Genauigkeit der Methode noch weiter erhöhen. Da ja natürlich im erfindungsgemäßen Verfahren nicht nur ein Molekül DNA bestimmt wird, sondern derer viele für die Bestimmung und die Erzeugung eines detektierbaren Signals nötig sind, kann es auch vorkommen, daß in manchem Strang der richtige Einbau eines Nukleotids fälschlicherweise unterbleibt. Dann könnte auch in der Folge das wiederum nächste Nukleotid nicht eingebaut werden, diese Nukleinsäuren würden also für die weitere Signalgebung ausfallen. Mit einem nicht markierten Nukleotid werden daher eventuelle Fehlstellen nochmals ausgefüllt, so daß für alle Nukleinsäuren gleiche Ausgangsbedingungen für den nächsten Zyklus der Schritte (1) bis (4) mit dem nächsten Nukleotid gegeben sind.

Bei Verwendung einer Festphasengebundenen Nukleinsäure zur Sequenzierung ist es auch möglich, mehrere und zwar sehr viele Nukleinsäuren gleichzeitig zu bestimmen. Hierzu werden auf eine feste Phase in räumlicher Trennung die zu sequenzierenden Nukleinsäuren verankert und diese gleichzeitig mit den verschiedenen Inkubationsmischungen und Lösungen behandelt. Dabei kann man im verkleinerten Maßstab eine Art Mikrostruktur herstellen und auf einem solchen "DNA-Chip" im Mikromaßstab (siehe Fig. 2) Hunderte bis Tausende von DNA-Proben gleichzeitig sequenzieren. Die DNA kann dabei durch eine Art automatisierte und computergesteuerte Zellenmikroinjektion auf der festen Phase verankert werden. Auch hier sind jedoch alle anderen an sich bekannten Verankerungsarten möglich. Des weiteren kann die Nukleinsäure auch am Boden einer Mikrotiterplatte verankert werden und die Lösungen und In-

kubationsmischungen in die Vertiefungen eingebracht und wieder entfernt werden.

Wie bereits vorher erwähnt, ist es im Rahmen der Erfindung besonders bevorzugt, die Sequenzierung in einem Automaten durchzuführen. Dabei kann zur Bestimmung der Markierung insbesondere eine Charge Coupled Device (CCD) Kamera verwendet werden.

Das erfindungsgemäße Verfahren, welches eine gänzlich neue Technik zur Sequenzierung von DNA darstellt, ohne die Notwendigkeit der Auftrennung auf Agarose- oder Polyacrylamidgelen stellt eine schnelle und äußerst genaue Möglichkeit dar, Nukleinsäuren zu sequenzieren. Bereits die Bestimmung von sehr kleinen Mengen an Nukleinsäuren, um ein vielfaches weniger als bei den bisherigen Methoden, ist möglich, da jedes DNA-Molekül zum Markierungssignal beiträgt, während sich bei den bisherigen Methoden eine statistische Verteilung von Fragmenten der Nukleinsäure und damit für jedes zu bestimmende Nukleotid nur ein Bruchteil der Ausgangsmenge von Nukleinsäuren zur Verfügung steht.

Die Genauigkeit der Methode basiert auf der Tatsache, daß die Extension der polymerisierten Kette unterbrochen wird, sobald das Polymeraseenzym bei einer Base auf dem Templatestrang ankommt, die nicht in der Inkubationsmischung mit den markierten Nukleotiden, mit welcher die Nukleinsäure inkubiert wird, vorhanden ist. Theoretisch kann es zwar zum falschen Einbau einer Base kommen, wodurch sich ein geringes Backgroundsignal ergeben würde, jedoch wird nach dem Markierungsentsfernungsschritt (4) auch die falsche Markierung entfernt, weshalb das falsche Signal nicht akkumulieren kann, was die Auflösung nach einigen Zyklen beeinträchtigen könnte. Aus diesem Grund ist der Background im erfindungsgemäßen Verfahren sehr gering und die Genauigkeit der Sequenzbestimmung entsprechend hoch.

Um die Genauigkeit der Sequenzbestimmung nochmals weiter zu erhöhen, kann die zu bestimmende Nukleinsäureprobe in vier Teilproben aufgetrennt werden und dann jeweils alle Schritte des erfindungsgemäßen Verfahrens mit jeweils den vier Nukleinsäurealiquots durchgeführt werden. Die Sequenz wird dann nicht nur über das positive Signal aus der einen Probe bestimmt, in der der Einbau eines markierten Nukleotids stattgefunden hat, sondern auch über das Fehlen eines Signals in den Proben, welche mit den anderen drei markierten Nukleotiden inkubiert wurden.

Zusammenfassend bietet das erfindungsgemäße Verfahren eine schnelle und leicht automatisierbare Möglichkeit, mit großer Genauigkeit die Sequenz von Nukleinsäuren auch bei Vorhandensein nur ganz geringer Mengen derselben zuverlässig festzustellen.

Die folgenden Figuren erläutern die Erfindung weiter:

Fig. 1 zeigt ein Flußschema für das erfindungsgemäße Verfahren.

Fig. 2 zeigt die Anordnung vieler verschiedener Nukleinsäuren, hier DNA-Moleküle, auf einer festen Phase im Mikromaßstab zur gleichzeitigen Prozessierung.

Fig. 3 zeigt die Detektion des Einbaus von Fluorescein-12-dUTP durch Klenow-DNA-Polymerase.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Sequenzierung von Nukleinsäuren, bei dem man zu einer zu sequenzierenden, zumindest teilweise einzelsträngigen Nukleinsäure

als Template-Strang mit Hilfe einer geeigneten Polymerase und allen vier Nukleotiden, ausgehend von einem Primer oder einem doppelsträngigen Teilstück, Schritt für Schritt einen Komplementärstrang synthetisiert, wobei man markierte Nukleotide verwendet, und welches folgende Schritte umfaßt:

(1) Inkubieren der mit dem Primer versehenen oder teilweise doppelsträngigen Nukleinsäure mit einer Inkubationsmischung, bestehend aus einer Polymerase, einer der vier Nukleotidarten in markierter Form und anderen für die Kettenpolymerisation benötigten Substanzen, wobei ein markiertes Nukleotid in den wachsenden Komplementärstrang eingebaut wird in dem Fall, daß das nächste auf dem Template-Strang vorhandene Nukleotid zu dem verwendeten markierten Nukleotid komplementär ist,

(2) Trennen der gegebenenfalls um ein Nukleotid verlängerten Nukleinsäure von der Inkubationsmischung von Schritt (1) und Durchführung eines oder mehrerer Waschschritte in an sich bekannter Weise,

(3) Bestimmen des Einbaus eines Nukleotids anhand seiner Markierung, und

(4) falls der Einbau eines markierten Nukleotids erfolgt ist, Entfernen der Markierung,

wobei die Schritte (1) bis (4) jeweils cyclisch für alle vier Nukleotidarten durchgeführt werden.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die zu sequenzierende Nukleinsäure vor Schritt (1) an einer festen Phase verankert wird.

3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Verankerung über ein spezifisches Bindepaaar erfolgt, dessen einer Partner mit der festen Phase verbunden ist und dessen anderer Partner an die Nukleinsäure gebunden ist.

4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß man als spezifisches Bindepaaar das System Biotin/Avidin oder Biotin/Streptavidin verwendet.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß man als feste Phase Glas, eine Polymermembran oder Polymer- oder Glaskügelchen (beads) verwendet.

6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß man als Primer ein Oligonukleotid vor die zu sequenzierende Sequenz anhybridisiert.

7. Verfahren nach Anspruch 1 oder 6, dadurch gekennzeichnet, daß man für die Schritte (1) bis (4) ein Durchflußsystem verwendet, bei dem die Nukleinsäure in Lösung bleibt und mit Hilfe von Filtern oder/und Kapillaren von anderen Substanzen getrennt wird.

8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß man als Markierung der Nukleotide eine Fluoreszenzmarkierung verwendet.

9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß man als Nukleotide Deoxyribonukleotide verwendet.

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß man als Nukleotide Dideoxyribonukleotide verwendet und diese nach erfolgter Bestimmung der Markierung in Schritt (3) oder gegebenenfalls nach Schritt (4) in Deoxyribo-

nukleotid-ähnliche polymerisationsverlängerbare Nukleotide überführt.

11. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß man alle vier Nukleotidarten mit jeweils verschiedenen Fluoreszenzmarkierungen zusammen in einer Inkubationsmischung in Schritt (1) einsetzt und die Unterscheidung der eingebauten Nukleotide über deren Markierung erfolgt.

12. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß man die Nukleinsäure vor der Sequenzierung denaturiert.

13. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß man nach Schritt (3) oder (4) mit einem dem verwendeten markierten Nukleotid von Schritt (1) entsprechenden nicht markierten Nukleotid eventuell vorhandene Lücken im Komplementärstrang auffüllt.

14. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6 und 8 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß man auf der festen Phase mehrere zu sequenzierende Nukleinsäuren in räumlicher Trennung voneinander verankert und diese simultan sequenziert.

15. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß man die Schritte (1) bis (3) und gegebenenfalls (4) in einem Automaten durchführt.

16. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß man zur Bestimmung der Markierung eine Charge Coupled Device (CCD) Camera verwendet.

Hierzu 3 Seite(n) Zeichnungen

35

40

45

50

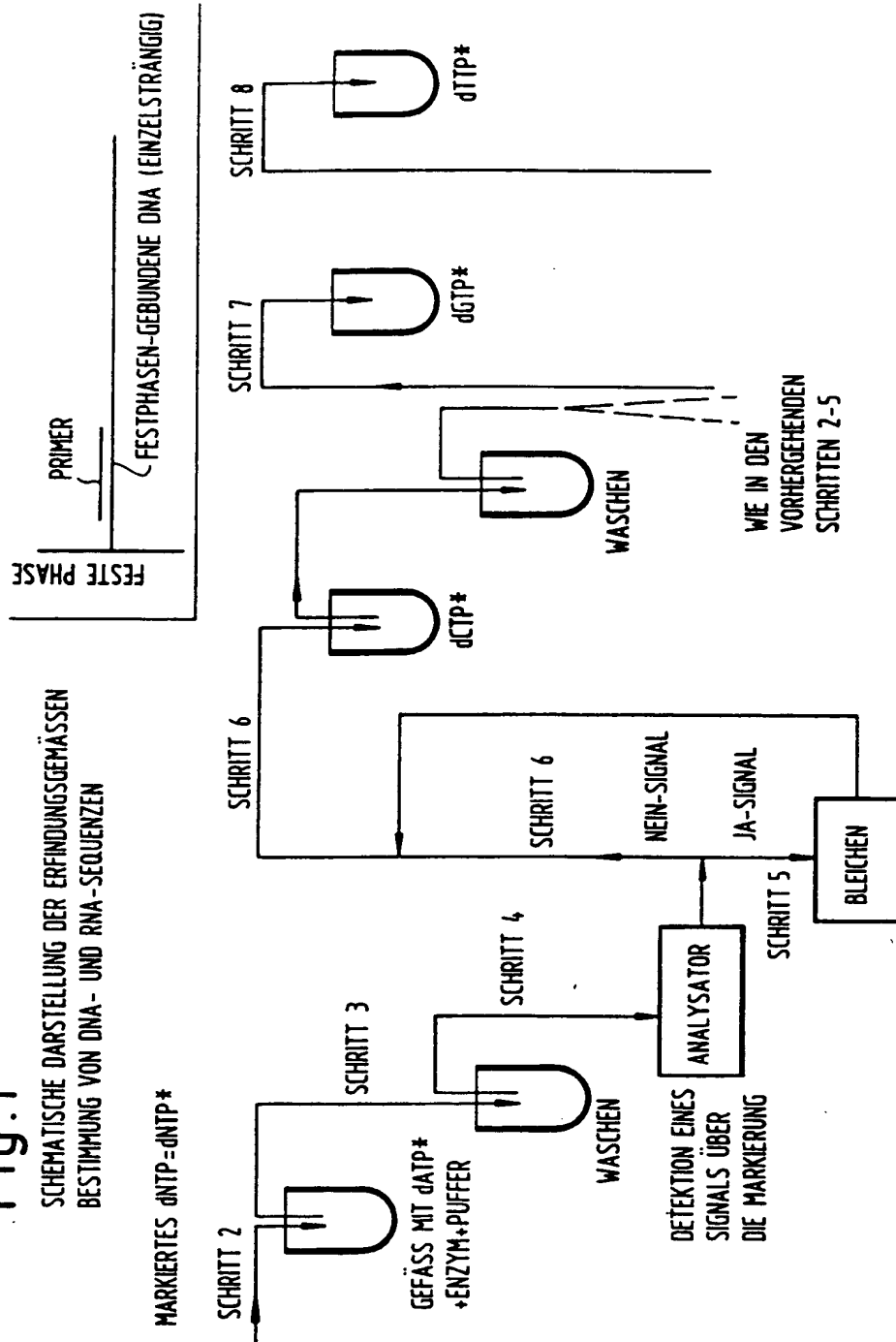
55

60

65

Fig.1

SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER ERFINDUNGSGEMÄSSEN
BESTIMMUNG VON DNA- UND RNA-SEQUENZEN



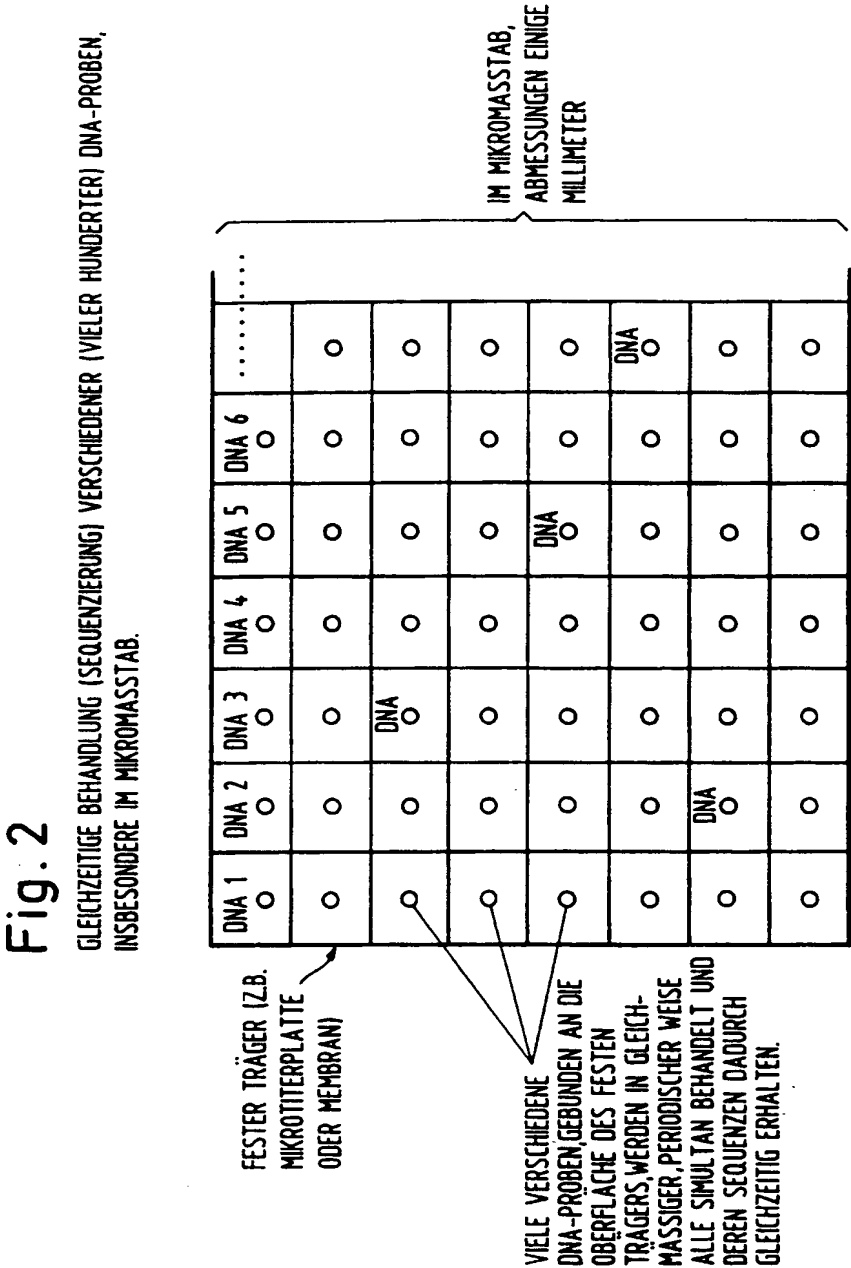


Fig. 3

ENZYMATISCHER EINBAU VON FLUORESCEIN-12-dUTP
DURCH KLENOW-DNA-POLYMERASE DETEKTIERT WERDEN $\sim 10^{-17}$ MOL
DES MARKIERTEN DNA-FRAGMENTS

